

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.3.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 3月24日

RECEIVED

15 APR 2004

WIPO PCT

出願番号  
Application Number: 特願2003-080847

[ST. 10/C]: [JP2003-080847]

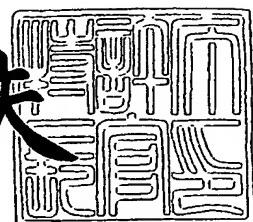
出願人  
Applicant(s): 独立行政法人国際農林水産業研究センター  
生物系特定産業技術研究推進機構

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 2日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0103  
【提出日】 平成15年 3月24日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
A01H 5/00  
C12N 1/19  
C12N 1/21  
【発明の名称】 ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法  
【請求項の数】 10  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻2丁目11-807-508  
【氏名】 篠崎 和子  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代1-4-17 ジュネス1 205  
【氏名】 桂 幸次  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市上横場字石居1894-8 中村ハイツ  
102  
【氏名】 伊藤 裕介  
【特許出願人】  
【識別番号】 501174550  
【氏名又は名称】 独立行政法人 国際農林水産業研究センター  
【特許出願人】  
【識別番号】 000195568  
【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

**【代理人】**

【識別番号】 100091096

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 平木 祐輔

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100118773

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 藤田 節

**【選任した代理人】**

【識別番号】 100119183

**【弁理士】**

【氏名又は名称】 松任谷 優子

**【手数料の表示】**

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 50／100

**【提出物件の目録】**

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる、イネ由来のプロモーター。

- (a) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNA
- (b) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス誘導性のプロモーター活性を有するDNA

【請求項2】 前記ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項1記載のプロモーター。

【請求項3】 請求項1又は2記載のプロモーターを含む組換えベクター。

【請求項4】 請求項1又は2記載のプロモーター支配下にさらにストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を機能しうる態様で含む、請求項3記載のベクター。

【請求項5】 ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子がプロリン合成の鍵酵素P5CS遺伝子、ガラクチノール合成遺伝子AtGOLS3遺伝子、シロイスナズナ由来転写因子DREB遺伝子、イネ由来転写因子OsDREB遺伝子、及びABA合成酵素NCED遺伝子から選ばれる、請求項4記載のベクター。

【請求項6】 ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子がイネ由来転写因子OsDREB遺伝子である、請求項5記載のベクター。

【請求項7】 請求項3～6のいずれか1項に記載のベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

【請求項8】 宿主が植物である、請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】 宿主が单子葉植物である、請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項1又は2記載のプロモーターを植物に導入することにより、該植物のストレス耐性を向上させる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、イネ由来のストレス誘導性プロモーターとその利用方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

植物は、乾燥、高温、凍結、塩など、自然界における様々な環境ストレスに対応するための耐性機構を有している。最近では、こうしたストレス耐性機構が分子レベルで明らかになるにつれ、バイオテクノロジー的手法を用いたストレス耐性植物も作出されるようになってきた。例えば、ストレスを受けた細胞内にはLEAタンパク質、水チャネルタンパク質、適合溶質合成酵素などのストレスタンパク質が誘導され、細胞をストレスから防御する。そこで、オオムギのLEAタンパク質やタバコのdetoxification enzyme等の遺伝子、浸透圧調節物質(糖、プロリン、グリシンベタイン等)合成酵素の遺伝子を植物に導入する研究が試みられた。また、細胞膜脂質の修飾酵素であるシロイヌナズナのw-3 fatty acid desaturaseやらん藻のD9desaturaseの遺伝子等を用いた研究も試みられた。これらの研究では、いずれも一つの遺伝子がカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターに結合して植物に導入された。しかし、組換え植物のストレス耐性度が不安定であったり、導入遺伝子の発現レベルが低い等の問題から実用化に至ったものはなかった。

**【0003】**

一方、ストレス耐性機構には複数の遺伝子が複雑に関与することがわかつてきた(例えば、非特許文献1参照)。そこで、それらの発現を同時に活性化する転写因子の遺伝子を恒常的プロモーターに連結して導入し、植物のストレス耐性を高める研究も試みられた(例えば、非特許文献2参照)。しかし、複数の遺伝子が同時期に活性化されると、宿主植物のエネルギーが該遺伝子産物の生成や、該遺伝子産物に起因する細胞内代謝に向けられるため、植物自体の成長が遅れたり矮化してしまうという問題があった。

**【0004】**

これに対し、発明者らはシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)からストレス応答性エレメントに結合し、該エレメント下流の遺伝子の転写を特異的に活性化

する転写因子をコードする遺伝子、DREB1A、DREB1B、DREB1C、DREB2A、DREB2Bを単離した（例えば、特許文献1参照）。そして、これらの遺伝子をストレス誘導性rd29Aプロモーターに連結して植物に導入することにより、矮化しないストレス耐性植物が作製できることを報告した（例えば、特許文献2参照）。

### 【0005】

しかし、双子葉植物であるシロイヌナズナ由来のrd29Aプロモーターは、单子葉植物中で機能はしてもその活性が弱い。したがって、单子葉植物において強い活性を有するストレス誘導性プロモーターが望まれていた。

### 【0006】

#### 【特許文献1】

特開2000-60558号公報

#### 【特許文献2】

特開2000-116260号公報

#### 【非特許文献1】

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. Plant Physiol. 1997 Oct;115(2) p327-334

#### 【非特許文献2】

Liu et al., (1998) The Plant Cell, 10:1391-1406

### 【0007】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、イネ等の单子葉植物において効果的に機能し得るストレス誘導性プロモーターを見出し、該プロモーターを用いて新規な環境ストレス耐性植物を提供することを目的とする。

### 【0008】

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため銳意検討した結果、イネゲノムより、強いストレス誘導性プロモーターを単離することに成功した。そして、該プロモーターを用いれば、单子葉植物の環境ストレス耐性を著しく向上させることが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

**【0009】**

すなわち、本発明はイネ由来のストレス誘導性プロモーターに関する。該プロモーターは、具体的には以下の(a)又は(b)のDNAからなる。

(a) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス誘導性のプロモーター活性を有するDNA

ここで、ストレスとは、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである。

**【0010】**

また、本発明は前記プロモーターを含む組換えベクターを提供する。該ベクターは、本発明のプロモーター支配下に他の構造遺伝子や調節遺伝子を含んでいてもよく、特にストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を含んでいることが好ましい。

**【0011】**

ストレス耐性を向上させる構造遺伝子の好適な例としては、プロリン合成の鍵酵素P5CS遺伝子 (Yoshiba Y. et al (1999) BBRC 261) 、ガラクチノール合成遺伝子AtGolS3遺伝子 (Taji T. et al (2002) Plant J. 29 : 417-426) が挙げられる。

**【0012】**

また、ストレス耐性を向上させる調節遺伝子の好適な例としては、シロイスナズナ由来転写因子DREB遺伝子 (特開2000-60558号公報) 、イネ由来転写因子OsDREB遺伝子 (特願2001-358268、Dubouzet et al Plant J. in press) 、及び植物ホルモンABAの生合成の鍵酵素NCED遺伝子 (Iuchi S. et al (2001) Plant J. 27 : 325-333) 等が挙げられる。

特に、シロイスナズナ由来転写因子DREB遺伝子、イネ由来転写因子OsDREB遺伝子が好ましく、イネ由来転写因子OsDREB遺伝子が最も好ましい。

**【0013】**

さらに、本発明は本発明のベクターを適當な宿主に導入して得られる形質転換体を提供する。ある態様において、該形質転換体は本発明のベクターを宿主植物

に導入して得られるトランスジェニック植物である。この場合、宿主植物としては単子葉植物が望ましく、単子葉植物としてはイネが望ましい。

#### 【0014】

さらにまた、本発明は、本発明のプロモーターを植物に導入することにより、該植物のストレス耐性を向上させる方法を提供する。本発明のプロモーターは単子葉植物において従来にない強いストレス誘導性プロモーター活性を有するため、単子葉植物のストレス耐性の向上により適している。

以下、本発明について詳細に説明する。

#### 【0015】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のプロモーターは、低温、乾燥、塩などの環境ストレスに対して特異的に誘導されるイネ由来のプロモーターである。

##### 1. 本発明のプロモーターの同定

本発明のプロモーターは、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体間で、その発現が著しく異なる遺伝子（ストレス誘導性遺伝子）をスクリーニングし、次いでゲノム情報から該遺伝子のプロモーターと考えられる配列をスクリーニングすることにより同定することができる。

以下、本発明のプロモーターを同定するプロセスについて説明する。

#### 【0016】

##### 1. 1 mRNAの調整

まず、ストレス誘導性遺伝子をスクリーニングするための、mRNAを調製する。mRNAの供給源としては、葉、茎、根、花など植物体の一部又は全体のいずれであってもよい。また、植物体は、その種子をGM培地、MS培地、#3培地などの固体培地に播種し、無菌条件下で生育させた植物体を用いてもよいし、カルスや無菌条件下で育てた植物体の培養細胞を用いてもよい。

#### 【0017】

本スクリーニングでは、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体との間での遺伝子発現量の相違を比較するため、mRNAは前記両個体のそれぞれについて調整する必要がある。ストレスの負荷方法は、用いる植物によって適宜設定

される。一般には、乾燥ストレスは、2~4週間、水を与えず育てることにより負荷することができる。また低温・凍結ストレスは、15~-10°Cで、1~10日間育てることにより負荷することができる。さらにまた、塩ストレスは100~600mM NaClで1時間~7日間育てることにより負荷することができる。例えば、イネの場合であれば、水耕栽培で生育させたイネを、低温ストレスなら10~-4°C、塩ストレスなら150~250mM NaCl、乾燥ストレスなら脱水状態等に暴露する。

#### 【0018】

ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体は、それぞれ液体窒素で凍結し、乳鉢などで摩碎後、得られた摩碎物から、グリオキサール法、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテイナーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより粗RNA画分を抽出する。次いで、この粗RNA画分から、オリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロースなどを用いたアフィニティカラム法、あるいはバッチ法によりポリ(A)+RNA(mRNA)を得る。必要であれば、さらにショ糖密度勾配遠心法などによりmRNAを分画して用いてもよい。

#### 【0019】

##### 1. 2 ストレス誘導性遺伝子のスクリーニング

ストレス誘導性遺伝子のスクリーニングは、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体間で、その遺伝子発現量の相違を比較することにより行う。遺伝子発現量の比較方法は、特に限定されず、例えば、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サプラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、又はクロスハイブリダイゼーション法等の公知の方法を用いることができる。

#### 【0020】

なかでも、遺伝子チップ、cDNAマイクロアレイ等の固相試料を用いた方法は、数千~数万の遺伝子の発現を、定性的かつ定量的に、一度で検出することが可能という点で、前記スクリーニングの実施に好適である。

#### 【0021】

##### (1) cDNAマイクロアレイの調製

前記スクリーニングに用いるcDNAマイクロアレイは、プロモーターの検出対象である単子葉植物（例えばイネ）のcDNAがスポットされているものであれば特に限定されず、既成のものを用いてもよいし、公知の方法に基づいて作製してもよい（例えば、The Plant Cell (2001) 13 : 61-72 Seki et al参照）。

#### 【0022】

cDNAマイクロアレイの作製には、まず目的とする植物のcDNAライブラリーの調製が必要である。cDNAライブラリーは、(1)の方法に従って調製したmRNAを鋳型として、公知の方法により作製することができる。スポットするcDNAは単子葉植物由来のものであれば特に限定されないが、後のゲノムデータベースの解析の利便性からイネ等のゲノム解析が進んだ単子葉植物のものが好ましい。植物は平常状態（無処理）の植物でもよいが、好ましくは乾燥、塩、低温等のストレスに暴露した植物である。

#### 【0023】

cDNAライブラリーの作製では、まず市販のキット (ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製) 等) を用いて、mRNAを逆転写して一本鎖cDNAを合成し、これを鋳型として二本鎖cDNAを合成する。次いで、得られた二本鎖cDNAに適切な制限酵素切断部位を含むアダプターを付加した後、ラムダファージベクターのクローニング部位に挿入する。これを市販のキット（例えば、Gigapack III Gold packaging extract (STRATAGENE社製) 等）を用いて *in vitro* パッケージングし、宿主大腸菌に感染・増幅すれば、目的とするcDNAライブラリーが得られる。

#### 【0024】

cDNAライブラリーが作製されたら、このcDNA、あるいは該cDNAのうち特異性の高い部分（例えば、3' 側の反復配列を含まないUTR領域）をPCR増幅し、アレイ固定用プローブを作製する。この作業を繰り返して目的とする全ての遺伝子のプローブが調製できたら、これらを市販のスポットター（例えば、Amersham社製など）を用いてスライドグラス上にスポットティングする。かくして、目的とするcDNAマイクロアレイが得られる。

#### 【0025】

##### (2) 遺伝子発現量の検出

cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現量の検出は、サンプルmRNA（或いはcDNA）を適当な試薬でラベルし、これをアレイ上のcDNAプローブとハイブリダイズさせたときのシグナル強度として測定することができる。遺伝子の発現量は、通常アレイ上にスポットされたcDNAプローブ量のばらつきを考慮し、適当なコントロールとの比較値、あるいは比較する2サンプル間の発現量比として求めることが望ましい。本スクリーニングの場合であれば、ストレスを負荷しない無処理の植物由来のmRNAをコントロールとして、ストレスを付加した植物由来のmRNAの相対的発現量を検出すればよい。

#### 【0026】

検出は、コントロールとサンプルのmRNA（あるいはそのcDNA）を、それぞれ異なる蛍光色素（例えば、Cy3とCy5）でラベルし、アレイ上のcDNAプローブと共にハイブリダイズさせることにより行う。例えば、ストレスを負荷した個体よりmRNAを抽出し、Cy5標識dCTP存在下逆転写してCy5標識cDNAを調製する。次に、ストレスを負荷しない無処理の個体よりmRNAを抽出し、同様の方法でCy3標識cDNAを調製する。Cy5標識cDNA（サンプル）とCy3標識cDNA（コントロール）を等量ずつ混合し、アレイ上のcDNAとハイブリダイズさせる。なお、標識用色素はサンプルにCy3を、コントロールにCy5を利用してもよいし、他の適当な標識試薬を用いてもよい。

#### 【0027】

得られた蛍光強度を蛍光シグナル検出機で読み取り、数値化すれば、この値はコントロールに対するサンプルの遺伝子発現量比に相当する。スキャナーで読み取った蛍光強度は必要に応じて、誤差の調整や各試料毎のばらつきの正規化を行ってもよい。正規化は、ハウスキーピング遺伝子等各サンプルで共通に発現している遺伝子を基準に行うことができる。さらに、信頼性限界ラインを特定して、相關性の低いデータを除いてもよい。

#### 【0028】

##### (3) ストレス誘導性遺伝子の選択

ストレス誘導性遺伝子は、上記アレイによる解析の結果、ストレスを負荷した植物個体と負荷しない植物個体との間で発現量が著しく異なる遺伝子として特定

される。ここで、「著しく異なる」とは、例えば、インテンシティー1000以上で、両者の発現量が少なくとも3倍以上異なることを意味する。

### 【0029】

#### (4) ノザン・プロッティングによる発現解析

こうして選択された遺伝子は、さらにノザン解析等により、ストレス誘導性に当該遺伝子の発現が高まることを確認する。例えば、前述した方法で、様々なレベルの塩、乾燥、温度等のストレスに植物を暴露する。そして、該植物からRNAを抽出し、これを電気泳動にかけて分離する。分離されたRNAはニトロセルロース膜に転写し、前記遺伝子に特異的な標識cDNAプローブとハイブリダイゼーションさせれば、その発現量を検出することができる。

### 【0030】

選択された遺伝子が、ストレス依存的に発現が向上していれば、該遺伝子はストレス誘導性であることが確認できる。こうして、イネcDNAライブラリーより選択されたストレス誘導性遺伝子の例として、本発明にかかるa0022 (lip9: 配列番号2) 及びa0066 (Wsi724: 配列番号8) を挙げることができる。なお、a0022及びa0066はマイクロアレイ上に固定されているcDNAのID No. である。

### 【0031】

#### 1. 3 プロモーター配列のスクリーニング

##### (1) 遺伝子データベースからの推定

次に、既存の遺伝子データベース（例えば、DDBJのデータベース等）を基に検索ソフト（例えば、Blast等）を用いてストレス誘導性遺伝子のプロモーター配列を検索する。イネのように、ほとんどのゲノムが解読されている植物では、特定されたストレス誘導性遺伝子を支配するプロモーター配列の探索は既存のデータベースを用いてすべて可能となる。プロモーター配列は、ゲノム上で前記ストレス誘導性遺伝子（cDNA）と相同性の高いゲノム遺伝子の上流領域から、プロモーターと考えられる領域として選ばれる。例えば、ストレス誘導性遺伝子のゲノム情報に基づき、これらの遺伝子の開始コドンと推定される位置から約1～2 kb上流付近をプロモーター領域と推定する。

### 【0032】

ところで、公知のストレス誘導性プロモーターの中には、その配列中に該プロモーター活性に関わるシスエレメント；例えば、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE ; dehydration-responsive element)、アブシジン酸応答性エレメント(ABRE ; abscisic acid responsive element)、低温ストレス応答性エレメントなど、を有するものがある。このシスエレメントにストレス誘導性の転写因子が結合すると、前記プロモーターが活性化され、その支配下にあるストレス耐性付与遺伝子を発現させる。したがって、検索した上流領域に前記シスエレメントが含まれていれば、その領域はストレス誘導性プロモーターである可能性が非常に高いといえる。

### 【0033】

かくして、前述のa0022 (lip9 : 配列番号2) と相同性が高い遺伝子のゲノム情報が得られ、その1.1kb上流領域より推定lip9プロモーター配列（配列番号1）がスクリーニングされた。同様にして、a0066 (Wsi724 : 配列番号8) と相同性が高い遺伝子の上流領域より推定Wsi724プロモーター配列（配列番号10）がスクリーニングされた。

### 【0034】

#### (2) ストレス誘導性プロモーターの機能確認

次に推定プロモーター配列について、ストレス負荷時における該プロモーター活性の変化により、その機能の確認を行う。

まず、前項で推定されたプロモーター配列を基にプライマーを作製し、ゲノムDNAを鑄型としてPCRを行い、プロモーターのクローニングを行う。次に、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結して作製したレポータープラスミドを植物に導入し、該植物（好ましくはそのT<sub>2</sub>世代）のストレス負荷時におけるレポーターの発現を調べる。なお、レポーターとしては、例えばβグルクロニダーゼ(GUS : pBI121, Clontech社等)、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子等が挙げられるが、活性が数値で与えられること、染色によって発現が視覚的に観察できるという点でGUSが好ましい。

### 【0035】

#### 1. 4 本発明のプロモーター

以上の結果、イネゲノム由来のlip9プロモーター配列（配列番号1）は、乾燥、低温、塩等の各ストレス依存的に高い発現を示すストレス誘導性プロモーターであることが確認された。

### 【0036】

このように、lip9プロモーターはすべてのストレスに対して特異的に誘導されるプロモーターである。以下にその構造的、機能的特徴を挙げる。

- 1) lip9プロモーターは、その構造中に乾燥ストレス誘導に関するシスエレメントDREを2つ含む（図2参照）。
- 2) lip9プロモーターは、シスエレメントDREに結合してその下流の遺伝子の転写を活性化させるイネ由来の転写因子：OsDREB1遺伝子（特願2001-358268号）の過剰発現体で高発現している。
- 3) lip9プロモーターにはOsDREB1遺伝子が結合するDRE配列が存在することからOsDREB遺伝子の過剰発現の最適プロモーターであることが予測される。

### 【0037】

一方、Wsi724プロモーターも、その構造中にDRE配列が2つ含まれていること、及びa0066のストレス負荷時の発現パターン（乾燥、塩、低温誘導性で、低温による誘導性が乾燥、塩に比べて遅い）から、OsDREB遺伝子のターゲットになっていることが予想された。

### 【0038】

なお、本発明のプロモーターは配列番号1又は配列番号10で示される塩基配列を有するDNAに限定されず、配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズしうるDNAも、ストレス誘導性プロモーター活性を有する限り、本発明のストレス誘導性プロモーターに含まれる。ここで、ストリンジエントな条件とは、ホルムアミド濃度が30～50%、37～50℃、6×SSCの条件、好ましくはホルムアミド濃度が50%、42℃、6×SSCの条件をいう。

### 【0039】

#### 2. 組換えベクター

本発明の組換えベクターは、本発明のプロモーターを含むベクターである。該

ベクターは、本発明のプロモーターの下流に他の構造遺伝子又は調節遺伝子を機能しうる態様で含んでいてもよい。そのような遺伝子の好適な例は、ストレス耐性向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子である。なお、「機能しうる態様」とは、他の構造遺伝子又は調節遺伝子が本発明のプロモーターの支配下で適切に発現されるような態様を意味する。

#### 【0040】

ここで、ストレス耐性向上させる構造遺伝子とは、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレス等の環境ストレスに対する植物の耐性を高める機能を担うタンパクをコードする遺伝子であって；例えば、LEAタンパク質、水チャネルタンパク質、適合溶質合成酵素、タバコのdetoxification enzyme、浸透圧調節物質(糖、プロリン、グリシンベタイン等)合成酵素、細胞膜脂質の修飾酵素であるシロイヌナズナのw-3 fatty acid desaturase、らん藻のD9desaturaseの遺伝子、プロリン合成の鍵酵素であるP5CS、ガラクチノール合成遺伝子AtGolS3遺伝子を挙げることができる。

#### 【0041】

また、ストレス耐性向上させる調節遺伝子とは、ストレス誘導性プロモーターの活性や、ストレス耐性を付与する遺伝子の発現を調節することにより、植物のストレス耐性向上させる遺伝子であって；例えば、シロイヌナズナ由来の転写因子：DREB1A、DREB2A、DREB1B、及びDREB1C遺伝子（特開2000-60558号公報参照）、イネ由来の転写因子：OsDREB1A、OsDREB1B、OsDREB1C、OsDREB1D、及びOsDREB2A遺伝子（特願2001-358268号）、ならびに植物ホルモンABAの生合成の鍵酵素であるNCED遺伝子等を挙げることができる。

#### 【0042】

特に、本発明のプロモーターが特定のシスエレメントを含む場合は、該シスエレメントに結合し、そのプロモーター活性を向上させる転写因子の遺伝子を、プロモーターアンダウ流に連結させることが好ましい。

#### 【0043】

前述のように、本発明にかかるlip9プロモーターはその構造内にDRE配列を2つ含む。したがって、lip9プロモーターの下流に連結させる遺伝子としては、DR

EB遺伝子又はOsDREB遺伝子（例えば、OsDREB1A、OsDREB1B、OsDREB1C、OsDREB1D、OsDREB2A遺伝子、OsDREB2B遺伝子）が好ましく、特にOsDREB遺伝子が最も好ましい。

#### 【0044】

また、Wsi724プロモーターもDRE配列を2つ含み、OsDREBのターゲットになっていることが予想されていることから、その下流に連結させる遺伝子としては、DR EB遺伝子又はOsDREB遺伝子（例えば、OsDREB1A、OsDREB1B、OsDREB1C、OsDREB1D、OsDREB2A遺伝子、OsDREB2B遺伝子）が好ましく、特にOsDREB遺伝子が最も好ましいと考えられる。

#### 【0045】

本発明のベクターは、適当なベクターに本発明のプロモーターあるいは、該プロモーターと他の調節遺伝子や構造遺伝子を機能しうる態様で連結（挿入）して構築される。プロモーターを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミドDNA、ファージDNAなどが挙げられる。プラスミドDNAとしては、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119などの大腸菌宿主用プラスミド、pUB110、pTP5などの枯草菌用プラスミド、YEp13、YEp24、YCp50などの酵母宿主用プラスミド、pBI221、pBI121などの植物細胞宿主用プラスミドなどが挙げられる。又はジDNAとしてはλファージなどが挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスをベクターとして用いてよい。

#### 【0046】

本発明のプロモーターのベクターへの挿入は、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、これをベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入して連結すればよい。

本発明の組換えベクターは、さらに、所望によりスプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などを含有してもよい。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などを用いることができる。

#### 【0047】

### 3. 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、プロモーター活性が発現し得る態様で宿主中に導入することにより構築することができる。ここで、宿主は本発明のプロモーターが機能しうるものであれば特に限定されないが、植物が好ましく、特にイネ等の単子葉植物がより好ましい。

#### 【0048】

植物や植物細胞を宿主とする場合、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ、シロイヌナズナ、タバコ、ニンジンなどから株化した細胞や該植物から調製したプロトプラストが用いられる。植物への組換えベクターの導入方法としては、Abelらのポリエチレングリコールを用いる方法[Abel, H. et al. Plant J. 5:421-427(1994)]やエレクトロポレーション法などが挙げられる。

#### 【0049】

### 4. ストレス耐性トランスジェニック植物

#### (1) トランスジェニック植物の作製

本発明のプロモーターの支配下に、ストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子を機能しうる態様で連結して植物に導入することにより、環境ストレス、特に、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレスなどに対して抵抗性が向上されたトランスジェニック植物を作出することができる。宿主植物としては、特に単子葉植物が好ましい。

#### 【0050】

植物宿主への本発明のプロモーター等の導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リポソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。従来、イネのような単子葉植物では、アグロバクテリウム感染法を用いたトランスジェニック植物の作製は困難といわれてきたが、アセトシリソングンを加えることによってアグロバクテリウムがイネに感染可能となり、単子葉植物においても利用可能となってきた。

#### 【0051】

以下にアグロバクテリウムを用いたトランスジェニック植物の作製について説

明する。

まず、本発明のプロモーターとストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子とを含むDNAを適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入して植物導入用組換えベクターを作製する。クローニング用ベクターとしては、pBI2113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドやpLGV23Neo、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

#### 【0052】

バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンスC58、LBA4404、EHA101、C58C1Rif<sup>R</sup>、EHA105等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入して、植物への形質導入用に用いる。

#### 【0053】

上記の方法以外に、三者接合法[Nucleic Acids Research, 12: 8711(1984)]によっても植物導入用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド(例えばpRK2013など)を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養して植物導入用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

#### 【0054】

植物体内で外来遺伝子などを発現させるためには、構造遺伝子の後に、植物用のターミネーターなどを配置させる必要がある。本発明において利用可能なターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているターミネーターであればこれらのものに限定されるものではない。

#### 【0055】

さらに、効率的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子を使用することが好ましい。その際に使用する選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホストランスクレアーゼ(htp)遺伝子及びビアラホス(bialaphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスクレアーゼ(bar)遺伝子等から選ばれる1つ以上の遺伝子を使用することができる。本発明のプロモーター及び選択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

こうして調製したアグロバクテリウムを採取した植物切片に感染させれば、目的とするトランスジェニック植物が作製できる。

#### 【0056】

トランスジェニック植物は、適切な抗生物質を加えた培地に播種し、目的のプロモーターや遺伝子を保有する個体を選択する。選択された個体は、ポンソル1号や黒土等の入った鉢に植え替えてさらに生育させる。一般に、導入遺伝子は宿主植物のゲノム中に同様に導入されるが、その導入場所が異なることにより導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。そこで、プローブとして導入遺伝子のDNA断片を用いたノザン法で検定することによつて、より導入遺伝子が強く発現している形質転換体を選抜することができる。

#### 【0057】

##### (2) ストレス耐性の確認

本発明のプロモーターやストレス耐性を向上させる構造遺伝子及び／又は調節遺伝子が、トランスジェニック植物及びその次世代に組み込まれていることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、PCR法又はサザン分析等を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

#### 【0058】

また、トランスジェニック植物における導入遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、該植物の細胞及び組織から常法に従ってRNAを抽出し、RT-PCR法又はノザン解析を用いて導入した遺伝子のmRNAを検出することにより行うことができ

る。あるいは、導入した遺伝子の転写産物を、抗体を用いたウエスタン分析等により直接、分析してもよい。

### 【0059】

本発明のプロモーターを導入したトランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性は、例えばバーミキュライト、パーライト、ボンソルなどを含む土を入れた植木鉢にトランスジェニック植物を植え、或いは水耕栽培を行い、各種環境ストレスを負荷した場合の生存を調べることによって評価することができる。環境ストレスとしては、低温、乾燥、塩等が挙げられる。例えば、乾燥ストレスに対する耐性は、2~4週間、水を与えずその生存を調べることにより評価することができる。また低温・凍結ストレスに対する耐性は、15~-10℃に、1~10日間おいた後、2日~3週間、20~35℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。また、塩ストレスは100~600mM NaClで1時間~7日間おいた後、1~3週間、20~35℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。かくして、本発明のプロモーターを用いれば、植物（特に単子葉植物）を矮化させることなくそのストレス耐性を著しく向上させることができる。

### 【0060】

#### (3) トランスジェニック植物の好適な例

本発明にかかるトランスジェニック植物の好適な例として、lip9あるいはWsi724プロモーター支配下にOsDREB遺伝子を機能しうる態様で連結したベクターをイネ、コムギ等の単子葉植物に導入したトランスジェニック植物を挙げることができる。lip9プロモーターにはDRE領域が2つ含まれているため、OsDREB遺伝子は該シスエレメントに結合することにより、効果的にそのストレス耐性効果を示すことができる。同様に、Wsi724プロモーターにもDRE領域が2つ含まれているため、OsDREB遺伝子の発現を高めて、植物のストレス耐性を向上させることができるもの。

### 【0061】

#### 【実施例】

以下に、実施例により本発明について具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

**〔実施例1〕 イネのストレス誘導性遺伝子の同定**

cDNAマイクロアレイとノザン解析により、イネのストレス誘導性遺伝子を探索した。

**【0062】****1. イネcDNAマイクロアレイの作製**

2～3週間水耕栽培したイネ（日本晴）をそれぞれ乾燥、塩、低温処理を行った。乾燥処理は室温で風乾し、塩処理は250mMのNaCl溶液で栽培し、低温処理は4℃で栽培した。各ストレス処理を行ったイネは液体窒素で凍結後、グアニジンチオシアネート一塩化セシウム法により全RNAを抽出し、Oligo(dt)-celluloseカラムを用いてmRNAを調製した。得られたmRNAを鑄型にして、HybriZAP-2.1 two-hybrid cDNA Gigapack cloning kit (STRATAGENE社製)を用いてcDNAを合成し、HybriZAP-2.1 ファージミドベクターのEcoRI-XhoI切断部位に挿入、クローニングした。このファージミドDNAをGigapack III Gold packaging extract (STRATAGENE社製)を用いてパッケージングした。得られた、cDNAを含むラムダファージ粒子を宿主大腸菌に感染させ増幅した後、ファージ懸濁液として回収した。

**【0063】**

上記cDNAクローンの塩基配列をシーケンスして約1500個の独立したクローンを選抜した。選抜したクローンをPCR法で増幅させ、GTMAS System (Nippon Laser and Electronic Laboratory)を用いて、poly-L-lysine-coatedマイクロスライドグラス(model S7444; Matsunami)にスタンピングした後、UVクロスリンクによって固定し、イネcDNAマイクロアレイを作製した (The Plant Cell (2001) 13: 61-72 Seki et al.)。

**【0064】****2. マイクロアレイ解析**

前項と同様の乾燥、塩、低温の各ストレス処理、又は100μMのアブシジン酸処理(5時間又は10時間)を行ったイネ、ならびに無処理のイネの各々からmRNAを精製した。無処理のイネ由来のmRNAをコントロール、各ストレス又はアブシジン酸処理したイネ由来のmRNAをサンプルとして、それぞれCy3、Cy5を用いた二蛍光

標識法を用いて、cDNAマイクロレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、インテンシティー：1000以上で、コントロールに比較して3倍以上の発現量が認められた遺伝子をストレス誘導性遺伝子の候補として選択した。かくして、a0022 (lip9 : 配列番号 2) 及びa0066 (Wsi724 : 配列番号 8) がストレス誘導性遺伝子として選択された。

### 【0065】

#### 3. ノザンハイブリダイゼーションによる発現解析

前項で選択された遺伝子の発現特性をノザンハイブリダイゼーションにより解析した。まず、イネをアブシジン酸、乾燥、低温、塩、水の各ストレスに暴露し、それぞれ0, 1, 2, 5, 10時間ごとにサンプリングした。なお、アブシジン酸、乾燥、低温、塩ストレスは、1. と同様の方法で付与し、水ストレスは純水に浸すことにより付与した。それぞれのサンプルから全RNAを調製し、電気泳動を行い、ノザン法により各遺伝子の発現を見た。結果を図1に示す。

### 【0066】

図1から明らかなように、a0022はアブシジン酸、乾燥、低温、塩の各ストレスにより発現が誘導され、特にアブシジン酸、乾燥、塩では早い時間帯に発現の上昇がみられ、低温では遅いに時間帯に発現の上昇がみられた。また、a0066は、そのストレス負荷時の発現パターン（乾燥、塩、低温誘導性で、低温による誘導性が乾燥、塩に比べて遅い）から0sDREBのターゲットになっていることが予想された。

### 【0067】

#### [実施例2] プロモーター配列の解析

##### 1. イネゲノムデータベースのスクリーニング

実施例1でストレス誘導性遺伝子として選択されたcDNA : a0022 (lip9 : 配列番号 2) について、DDBJのイネゲノムデータベースを利用し、blastにより相同部位の検索を行った。その結果、相同性が認められた遺伝子の開始コドンから5'側に向かって、1.1kb上流の配列をプロモーター配列（配列番号 1）として選択した。また、a0066 (Wsi724 : 配列番号 8) についても同様の検索を行い、そのプロモーター配列（配列番号 10）が選択された。

**【0068】**

図2にlip9のプロモーター領域の構造を示す。図2から明らかのように、lip9はその構造中に2ヶ所のシス配列DRE ((A/G)CCGAC)を持つことが確認された。また、Wsi724プロモーターについても、その構造中に2ヶ所のシス配列DRE ((A/G)CCGAC)を持つことが確認された。

**【0069】****2. クローニング**

選択されたプロモーター配列を基にプライマーを設計し、イネのゲノムDNAを鑄型としてPCRを行い、クローニングを行った。用いたプライマー配列及びPCR条件は以下のとおりである。

プライマー配列：

Forward primer: 5'-CACGAAGCTTCATCAGCTATTCAAA-3' (配列番号3)

Reverse primer: 5'-CCGGATCCTCGATCGATGGATTAGCTA-3' (配列番号4)

PCR条件：95度1分 55度1分 68度2分 30サイクル

**【0070】**

[実施例3] ストレスに対するlip9プロモーター活性

(1) トランスジェニック植物の作製

pBIG29APHSNotのプロモーター部位をトウモロコシのユビキチンプロモーターに置換して作られたG-ubiプラスミドをBamHI-HindIIIで切断し、同様に切断したlip9プロモーターの断片と連結した。lip9プロモーターを組み込んだプラスミドをBamHI-EcoRIで切断し、同様にpBI221(Clontech)をBamHI-EcoRIで切断し切り出したGus遺伝子と連結しGus発現コンストラクト (G-lip9:GUS)を作製した(図3)。プラスミドG-lip9:GUSを、培養後10% glycerolで洗浄したアグロバクテリウムEHA105にエレクトロポレーション法によって導入し、アグロバクテリウムEHA105(G-lip9:GUS)を作製した。このアグロバクテリウムEHA105(G-lip9:GUS)を以下のようにしてイネに感染させ、形質転換体を作製した。

**【0071】**

イネの種子を70%エタノールで1分浸漬し、さらに2%次亜塩素酸ナトリウムに1時間浸漬することにより滅菌し、次いで滅菌水により水洗後、N6D固体培地(1リ

ツトル当たり：CHU[N6] Basal Salt Mixture(Sigma社製) 3.98g、スクロース 30g、ミオイノシトール 100mg、カザミノ酸 300mg、L-プロリン 2878mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 1mg、2,4-D 2mg、ゲルライト 4g、pH 5.8)のプレートに9粒ずつ播種し、24日間培養してカルスを誘導した。形成された種子約20粒分のカルスを、新たなN6D固体培地に移植し、さらに3日間培養した。

### 【0072】

一方、上記アグロバクテリウムEHA105(G-lip9:GUS)を5mlのリファンピシリソ100mg/l、及びカナマイシン20mg/lを含むYEP培地(1リットル当たり：Bacto peptone 10g、Bacto yeast extract 10g、NaCl 5g、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 406mg、pH 7.2)で28℃で24時間培養した。このアグロバクテリウムを20mg/lのアセトシリソゴンを含むAAM培地(1リットル当たり：MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10mg、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3mg、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2mg、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 250μg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 25μg、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 25μg、KI 750μg、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 150mg、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250mg、Fe-EDTA 40mg、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 150mg、ニコチン酸 1mg、チアミン塩酸10mg、ピリドキシン塩酸 1mg、ミオイノシトール 100mg、L-アルギニン 176.7mg、グリシン 7.5mg、L-グルタミン 900mg、アスパラギン酸 300mg、KCl 3g、pH 5.2)でO.D. 660が0.1になるようにうすめ、20mlのアグロバクテリウム懸濁液を作製した。

### 【0073】

つぎに、前述の3日間培養したカルスにアグロバクテリウム懸濁液を加え、1分間混合した。その後このカルスを滅菌したペーパータオルに置き、余分なアグロバクテリウム懸濁液を除去した後、滅菌した濾紙を敷いた2N6-AS固体培地(1リットル当たり：CHU[N6] Basal Salt Mixture 3.98g、スクロース 30g、グルコース 10g、ミオイノシトール 100mg、カザミノ酸 300mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 1mg、2,4-D 2mg、アセトシリソゴン 10mg、ゲルライト 4g、pH 5.2)の上で25℃ 3日間、暗黒下で培養した。3日間の培養後、カルベニシリソ500mg/lを含む3%スクロース水溶液で白濁しなくなるまで十分に洗浄し、カルベニシリソ500mg/l及びハイグロマイシン10mg/lを含んだN6D固体培地上で1週間培養した。その後カルベニシリソ500mg/l及びハイ

ゲロマイシン50mg/lを含んだN6D固体培地に移植して、18日間培養した。さらにこのカルスを再分化培地(1リットル当たり:ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(日本製薬社製) 4.6g、スクロース 30g、ソルビトール 30g、カザミノ酸 2g、ミオイノシトール 100mg、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 0.1mg、NAA 0.2mg、カイネチン 2mg、カルベニシリン250mg、ハイグロマイシン50mg、アガロース 8g、pH 5.8)に移植した。1週間ごとに新しい培地に移植し直し、再分化して芽が1cm程度に生長したものはホルモンフリー培地(1リットル当たり:ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(日本製薬社製) 4.6g、スクロース 30g、グリシン 2mg、ニコチン酸 0.5mg、ピリドキシン塩酸 0.5mg、チアミン塩酸 0.1mg、ハイグロマイシン50mg、ゲルライト 2.5g、pH 5.8)に移植した。ホルモンフリー培地上で8cm程度に生長した植物体を合成粒状培土ボンソル1号(住友化学社製)を入れた植木鉢に移し、形質転換植物体の種子を得た。

#### 【0074】

同様にして、rd29Aプロモーター(Nature Biotechnology (1999) 17, 287-291)、又は35Sプロモーター、salTプロモーター(配列番号5)をGUS遺伝子上流に結合したコンストラクトを作製し、イネ及び／又はタバコに導入した。

#### 【0075】

なお、salTプロモーターは、lip9プロモーターと同様のスクリーニングによってイネゲノム中より単離されたストレス誘導性プロモーターである。salTプロモーターに対応するマイクロアレイ上のcDNAのID No.は、a2660である。salTプロモーターは、その構造中に特別なシス配列はもたないが、アブシジン酸、乾燥、低温、塩の各ストレスにより発現が誘導されることが確認されている(特願2002-377316号参照)。

#### 【0076】

##### (2) 乾燥ストレスに対するプロモーター活性

得られたGUS発現形質転換イネのT<sub>2</sub>世代は2週間水耕栽培し、実施例1と同様にして乾燥ストレスに暴露した。

Gus発現形質転換タバコの場合、T<sub>1</sub>世代は再生してきた植物体をプラントコ-

ン内で3～5週間生育させ、生長した葉を2等分し、一方をコントロールとし片方を室温で風乾し乾燥ストレスに暴露した。

### 【0077】

各形質転換イネ及びタバコについて、4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronideの分解による蛍光強度の変化からGUS活性を測定した。図4に、乾燥ストレス負荷時における各種プロモーター導入形質転換植物のGUS活性を示す。

図4から明らかなように、单子葉植物であるイネでは、rd29Aプロモーターよりもsaltプロモータやlip9プロモーターがより強いストレス誘導性を示した。特に、lip9プロモータはsaltの約2倍という、強い活性を示した。lip9プロモーターは双子葉植物であるタバコでもストレス誘導性プロモーター活性を示したが、イネに比較してその活性は弱かった。

### 【0078】

#### (3) 塩ストレスに対するプロモーター活性

次に、lip9プロモーター-GUSコンストラクト導入イネの植物体全体を塩水に浸し、GUS染色を行ったところ、植物体全体が染色された（図5）。このことから、lip9プロモーターは、ストレスを負荷された植物体全体で機能することが確認された。

### 【0079】

#### [実施例4] 形質転換イネ中の導入遺伝子とlip9及びWsi724遺伝子の発現

実施例3と同様にして、トウモロコシのユビキチンプロモーター、又は35Sプロモーター支配下にOsDREB1A遺伝子（配列番号6）又はDREB1C遺伝子（配列番号8）をイネに導入した形質転換体を作製した。そして、形質転換体の導入遺伝子OsDREB1A及びDREB1Cと、導入遺伝子が発現を変化させたと考えられるlip9(a0022)、Wsi724(a0066)、salt(a2660)のmRNAレベルをノザン解析により調べた。

### 【0080】

プローブとしては、OsDREB1A遺伝子（配列番号6）、DREB1C遺伝子（配列番号7）、lip9遺伝子（a0022：配列番号2）、Wsi724遺伝子（a0066：配列番号8）、salt遺伝子（a2660：配列番号9）を用いた（配列番号6、7については、配列表中の各コーディング領域の配列をプローブとして使用）。なお、コントロールと

して、ベクターのみを形質転換したイネを同様に解析した。

#### 【0081】

形質転換イネは、5日間30mg/mlハイグロマイシンを含む0.1%ベンレート溶液中で選抜した後、ポンソル1号の入った鉢に植え替えて12日間育てた。野性株も同様に育てた。各植物から全RNAを調製して、電気泳動を行い、実施例1と同様にノザン法で各遺伝子の発現を見た。結果を図6に示す。図中、a、b、cはそれぞれ形質転換体のラインを示す。

#### 【0082】

この結果、OsDREB1A、DREB1C遺伝子を導入された形質転換イネでは、プロモーター領域にDRE配列を持つlip9の発現は誘導されたが、プロモーター領域にDRE配列を持たないsaltの発現は導入遺伝子（OsDREB1AやDREB1C）の発現と一致しなかった。また、lip9と同様にプロモーター領域にDRE配列を持ち、OsDREBのターゲットになっていると予想されているWsi724遺伝子の発現も、これら形質転換体で誘導された。

#### 【0083】

lip9やWsi724プロモーター上にはDRE配列が存在し、OsDREB1A遺伝子の過剰発現体ではlip9遺伝子やWsi724遺伝子が高発現している。lip9やWsi724はOsDREB1AをはじめとするOsDREB遺伝子の標的遺伝子と考えられ、したがってlip9やWsi724プロモーターはOsDREB遺伝子を過剰発現するための最適なプロモーターと推定された。

#### 【0084】

[参考例1] pBE35S:OsDREB1A, G-ubi:OsDREB1A及びG35S- ShΔ:OsDREB1Aの作製  
まず、G-ubi, G35S- ShΔは以下のように作製した。まずpBIGプラスミド（Nucleic Acids Research 18: 203(1990)）をBamHIで切断・平滑化処理した後、連結してBamHI切断部位をつぶし、さらにHindIIIとEcoRIで切断した。この断片とpBIG2113Notプラスミドを同様に切断して得られる約1.2kbの断片とを連結して、pBIG2113Notプラスミドを作製した。

#### 【0085】

つぎにpBIG2113NotをHindIIIとBamHIで切断し、同様に切断されたrd29Aプロモ

ーターの断片(約0.9kb, *Nature biotechnology* 17: 287-291(1999))と連結して、pBIG29APHSNotプラスミドを作製した。さらにこのpBIG29APHSNotプラスミドをHindIIIとSalIで切断後、同様に切断されたトウモロコシのユビキチン遺伝子(Ub i-1)のプロモーターの断片(約2.0kb, *Plant Molecular Biology* 18: 675-689(1992))又はp35S-sh $\Delta$ -stopのCaMV 35Sプロモーターとトウモロコシのスクロースシンターゼ遺伝子(Sh1)のイントロンの一部を含んだ断片(約1.6kb, *Proceeding National Academy of Science USA* 96: 15348-15353(1999))と連結してG-ubiプラスミド又はG35S-Sh $\Delta$ プラスミドを作製した。

#### 【0086】

前記pBE2113Not, G-ubi及びG35S-Sh $\Delta$ はそれぞれBamHIで切断した後、同様に切断したイネの転写因子をコードするOsDREB1A遺伝子断片とligation high(東洋紡社製)を用いて連結し、得られた連結物により大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。形質転換体を培養後、該培養物からプラスミドpBE35S:OsDREB1A, G-ubi:OsDREB1A及びG35S-Sh $\Delta$ :OsDREB1Aをそれぞれ精製した。次いで、これらの塩基配列を決定し、OsDREB1A遺伝子がセンス方向に結合したものを見抜した。

#### 【0087】

上記のプラスミドpBE35S:OsDREB1Aを持つ大腸菌DH5 $\alpha$ とヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101及びアグロバクテリウムC58と共に、LB寒天培地を用いて28℃で24時間混合培養した。生成したコロニーを搔き取り、1mlのLB培地に懸濁した。この懸濁液10 $\mu$ lをリファンピシリン100mg/l、及びカナマイシン20mg/lを含むLB寒天培地に塗布し、28℃で2日間培養して、接合体アグロバクテリウムC58(pBE35S:OsDREB1A)を得た。一方上記のプラスミドG-ubi:OsDREB1AとG35S-Sh $\Delta$ :OsDREB1Aのプラスミドを、培養後10% glycerolで洗浄したアグロバクテリウムEHA105にエレクトロポレーション法によって導入し、アグロバクテリウムEHA105(G-ubi:OsDREB1A)とアグロバクテリウムEHA105(G35S-Sh $\Delta$ :OsDREB1A)をそれぞれ得た。

#### 【0088】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、単子葉植物において有効に機能しうるストレス誘導性プロモ

ーターが提供される。該プロモーターはDRE配列を含み、したがって、その支配下にOsDREB遺伝子等を連結して植物に導入すれば、イネ等の単子葉植物において、強いストレス耐性トランスジェニック植物を作出することができる。

### 【0089】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Japan International Research Center for Agricultural Sciences  
Bio-oriented Technology Research Advancement Institute

<120> Stress Inducible Promoter and Its Uses

<130> P03-0103

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1066

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

tcatcagcta tcatcaaagc gaaggaaaga aagaaaaata aaaggaaaag aactggctgg 60  
aaatttagaga agccccggac gactcgatct gggggtggca aattaatcag tgtgatcaac 120  
agggataact tatcccgatcc gaccatatcc accaaccaaa ccaagacccg atttggtagg 180

ctgtgaaaga cgatcgact ggaccctgat ctacggaccc catatgtcac cgtccaggc 240  
 tctggatctc tcccgtcgta ctaatcagac accgcgcgca cggtgccgta gctctcgagc 300  
 cgtgtccgc tcccaactcg tcacaaaagc gatcacagac tcttccttcc tctgctggta 360  
 gagaagaaaa attggccgca atgatgccga taaagaggaa aaaggatga gaatccgatg 420  
 gaaaaaaaaact gatgttaatc tatcgctact gctgcgcact aagacgaatc gtatccgaac 480  
 aagaaacgct tacgttactg ttccctaaatg gatcgctccg ctcatcaatt aaccaaaaaat 540  
 cgattaggaa attgacggac agcgacgccc gaagccaagt gtctcgctgc gtaggcgtcg 600  
 aggccctcgaa gcagagggag cggagaggcg gacgcgcgc ccacgcctcc tctccctcg 660  
 tgacacggcc gtctggctcc acatggcgcc gacctctccc gatgcgtcca cccgtccg 720  
 ggcaccgcca cgtcggaacc agccggccgc cccacgcgt tgccgacacg cgtcgccgc 780  
 ccactggctc acccgctgccc tgccctcgcc tgccccccat ctcgtcgcca tttcccgccc 840  
 acgcttcttgc tcctcgctgc gcctacgcgt acgtacgata caaacgcgc acctttcgat 900  
 cccctccgct atataaggag ggcatctgccc tcgcccaccc tttcatccga aagcaaaagc 960  
 gactcgtaac agctcaaaca agtcaagagc gaatagttct tgctgatctg ttgtttgatt 1020  
 acttttagttc tcgagaggct ttagctgaat ccatcgatcg aggatg 1066

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1245

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;400&gt; 2

gcttagcagag ctcgtcacag ctcacaaacaag tcaagagcga atagttcttgc ctgatctgtt 60  
 gtttggattac ttttagttctc gagaggctt agctgaatcc atcgatcgat catggaggat 120  
 gagaggaaca cggagagcca ccagggtggc gaggctgcag agcaggtgga ggtgaaggac 180  
 aggggcctct tcgacaacct ccttggcagg aagaaggacg atcagccgga ggagaagaag 240  
 catgaggagg agcttgcac cggcatggag aaggtctccg tggaagagcc aaagaaggag 300  
 gacgaccacg ccgagggcga gaagaaggag agcctcctct ccaagctgca ccgatccagc 360

tccagctcca gctcgtcgag tcatgaggaa gaggaggtga tcgatgacaa cggcgagggtg 420  
 gtcaagagga agaagaagaa ggggctcaag gagaagatca aggagaagct gcccgccac 480  
 aaggaccatg ccggtgagca tgctcctccg cccgcggcga cgggcttccc gcgcggc 540  
 cgctgcattcc gtggtgacgg ccgcgcacac gccactcctg ctccctgtt gactcacggc 600  
 gatcaccacc acgacaccgc cgtccccgtg gaaaagatcg agggtgatca cgccagacgg 660  
 aggcgaccct gccacgtgca cccgaggagg aaaaaaggc ttccctcgaca agatcaagga 720  
 gaagctgccc ggcggccaca agaagccgga agacgcaact gctgtgccgc cgccggccgc 780  
 ctcaccggct gctcctgcca ctactccggc gccagcacac ccaccggc 840  
 agtgagcagc ccggatggga aggagaagaa gggtatactg ggcaagatca tggagaaact 900  
 gccccgttac cacaaggcttccggcagga agacaagacc gccgcccgg ccaccggcga 960  
 gcacaagagc agcgcttaat tggggcgtgt gtgagaccag gccatggttt gaatttggaa 1020  
 gtgtttggcg tgtgttagtt tgggtcttt tctgcactgc agcttttta agttcgtgtc 1080  
 aagattggtc aaggcctggt cagcgaagcc cgatcagtga tcgaagttt tgggttgcgtgt 1140  
 ggggtacggg cttcagttt ctagtcaa gtactagatg ttgagttt ttaattatta 1200  
 ttggcactct tgtattgggtt ttgggttggg cattctgcct tggta 1245

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt; 3

cacgaagctt tcatcagcta ttcatcaa

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ccggatcctc gatcgatgga ttcagcta

28

<210> 5

<211> 1608

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

caacaaccac tactgaacac ggctaagtgt gtttcccttc ctcgaagatg tcgttattgc 60  
gttctttct gctattccat acatatcaat ctctagagga acaccttact ctagcttca 120  
gacaaggcac ggtggtaaat cacgtcgtat cctccatggg gtgtgctccg aaaaaccttc 180  
cctcatgcat tagagatcat gggtgaaatt tagcgatggc acaccttatt tataatttag 240  
ttactctccg gcggtaccat ctgcttcgt ttgttgatcg atgctggcga tgatgtgtgt 300  
gagtatcgat caacagaatg atcggacgct attttgggg tcgtttttt tcagcattga 360  
ggagggatga ggattgcttgc aacatgcag gtgctgctca aaacaacggt taagcagata 420  
tccgtcaatt tgatagtaag atctgttaacg cgtggcttt cgagctgaaa actatggact 480  
cttggaaaca aagataat tatattaaat tctattttc aaagatatct aaatatttag 540  
aaagatatta ataatgttat taaactttga cttactaaa acaagtccaa aactgcattgt 600  
ccctaaatcg ccagaagata aggaacacct gtacccgtga taacagaggg gtatgaaatt 660

tggacacgag gcttcttgg cagacgtggc gctgagttag cttggctgc ttggtaaac 720  
 tccgtgcagg gacattcagt tagctagcta gcagcattgt cgacaataag atagcctta 780  
 aatgttagca ctcaccagct tgtcaaaaac caaggcttgg tgacggcggc ttcagaatga 840  
 aggatagatg gataaatgtc tagaatatta taaagtccaa caaaagatgg agcacatgca 900  
 taaaaagatta cgtacacgaa tgcagttgat acagtggatg ttaggcataa gaagcactat 960  
 aaatagaggg tgcaatcccc attgccctac acaactacac aagtcgacta tcattacaag 1020  
 gaaatttaag cgaccacgaa ggtatgaaag catagcagta ctctgcattt ttttttttg 1080  
 atgttgttct agctagctct gcttaagggtt ttccttctt tcgttcttg ttttttttt 1140  
 gtaagctcaa ctagttgcat gcaatttaga tttatcctt ttacagttgg aaaaacatcc 1200  
 ctataaatat taccatgaat gcatagagat tcgaggaagc tacaatttgg acgactgatt 1260  
 caaaaaaaaa aaaaaaaaaatc agatggtcac atcattgcta ttgtttgtg aaagtacaaa 1320  
 agcactcggtt cggattcaaa ttacttgtc aaattaatta aaaaccatag aaatgatcat 1380  
 gttaccctta cacattcgg aaacaatacc atatatgtta gtgtgcgatc attcaaattt 1440  
 atttatatct gaacaaaact gagtggaaat acggtagca aacttgacga ttccaaaata 1500  
 atttatattt aggcaaaatt ttacaacttc aaagttcaaa caagctaacc tgaaaaatca 1560  
 tgttgaatt tactaagatg tgctttgtt tttactaaac agagtatg 1608

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (69)..(782)

&lt;400&gt; 6

CACACTCGAG CAGAGCAAAT ACAGTTCAAGG AATCAGGAGC AAGCAGAAAC ACACACACAA 60

ATCCGAAG ATG TGC GGG ATC AAG CAG GAG ATG AGC GGC GAG TCG TCG GGG 110

Met Cys Gly Ile Lys Gln Glu Met Ser Gly Glu Ser Ser Gly

1 5 10

TCG CCG TGC AGC TCG GCG TCG GCG GAG CGG CAG CAC CAG ACG GTG TGG 158

Ser Pro Cys Ser Ser Ala Ser Ala Glu Arg Gln His Gln Thr Val Trp

15 20 25 30

ACG GCG CCG CCG AAG AGG CCG GCG GGG CGG ACC AAG TTC AGG GAG ACG 206

Thr Ala Pro Pro Lys Arg Pro Ala Gly Arg Thr Lys Phe Arg Glu Thr

35 40 45

AGG CAC CCG GTG TTC CGC GGC GTG CGG CGG AGG GGC AAT GCC GGG AGG 254

Arg His Pro Val Phe Arg Gly Val Arg Arg Arg Gly Asn Ala Gly Arg

50 55 60

TGG GTG TGC GAG GTG CGG GTG CCC GGG CGG CGC GGC TGC AGG CTC TGG 302

Trp Val Cys Glu Val Arg Val Pro Gly Arg Arg Gly Cys Arg Leu Trp

65 70 75

CTC GGC ACG TTC GAC ACC GCC GAG GGC GCG GCG CGC GCG CAC GAC GCC 350

Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Gly Ala Ala Arg Ala His Asp Ala

80 85 90

GCC ATG CTC GCC ATC AAC GCC GGC GGC GGC GGC GGC GGG GGA GCA TGC 398

Ala Met Leu Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys

95 100 105 110

TGC CTC AAC TTC GCC GAC TCC GCG TGG CTC CTC GCC GTG CCG CGC TCC 446  
 Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Leu Leu Ala Val Pro Arg Ser  
 115 120 125

TAC CGC ACC CTT CGC CGA CGT CCG CCA CGC CGT GCC GAG GCC GTC GAG 494  
 Tyr Arg Thr Leu Arg Arg Pro Pro Arg Arg Ala Glu Ala Val Glu  
 130 135 140

GAC TTC TTC CGG CGC CGC CTC GCC GAC GAC GCG CTG TCC GCC ACG TCG 542  
 Asp Phe Phe Arg Arg Leu Ala Asp Asp Ala Leu Ser Ala Thr Ser  
 145 150 155

TCG TCC TCG ACG ACG CCG TCC ACC CCA CGC ACC GAC GAC GAC GAG GAG 590  
 Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Thr Pro Arg Thr Asp Asp Asp Glu Glu  
 160 165 170

TCC GCC GCC ACC GAC GGC GAC GAG TCC TCC CCG GCC AGC GAC CTG 638  
 Ser Ala Ala Thr Asp Gly Asp Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ser Asp Leu  
 175 180 185 190

GCG TTC GAA CTG GAC GTC CTG AGT GAC ATG GGC TGG GAC CTG TAC TAC 686  
 Ala Phe Glu Leu Asp Val Leu Ser Asp Met Gly Trp Asp Leu Tyr Tyr  
 195 200 205

GCG AGC TTG GCG CAG GGG ATG CTC ATG GAG CCA CCA TCG GCG GCG CTC 734  
 Ala Ser Leu Ala Gln Gly Met Leu Met Glu Pro Pro Ser Ala Ala Leu  
 210 215 220

GGC GAC GAC GGT GAC GCC ATC CTC GCC GAC GTC CCA CTC TGG AGC TAC 782  
 Gly Asp Asp Gly Asp Ala Ile Leu Ala Asp Val Pro Leu Trp Ser Tyr  
 225 230 235

TAGAGCTCAA TCAACTGTAC AATTTGCCT CTTTTTCTC TCTTTCTGG CTTCCGATGC 842  
 CAAAATTTG GTACTGTACG GACACTACTT TCGGTAATGT GATGGAACAA GTTGCAAAAC 902  
 AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAA 927

<210> 7  
 <211> 1437  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (167)..(1171)

<400> 7  
 gctgtctgat aaaaagaaga ggaaaactcg aaaaagctac acacaagaag aagaagaaaa 60  
 gatac gagca agaagactaa acacgaaagc gatttatcaa ctcgaaggaa gagactttga 120  
 tttcaaatt tcgtccccta tagattgtgt tgttctggg aaggag atg gca gtt 175  
 Met Ala Val

1  
 tat gat cag agt gga gat aga aac aga aca caa att gat aca tcg agg 223  
 Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp Thr Ser Arg  
 5 10 15

aaa agg aaa tct aga agt aga ggt gac ggt act act gtg gct gag aga 271  
 Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val Ala Glu Arg

20	25	30	35
tta aag aga tgg aaa gag tat aac gag acc gta gaa gaa gtt tct acc			319
Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu Val Ser Thr			
40	45	50	
aag aag agg aaa gta cct gcg aaa ggg tcg aag aag ggt tgt atg aaa			367
Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met Lys			
55	60	65	
ggt aaa gga gga cca gag aat agc cga tgt agt ttc aga gga gtt agg			415
Gly Lys Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg Gly Val Arg			
70	75	80	
caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gct gag atc aga gag cct aat cga			463
Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn Arg			
85	90	95	
ggt agc agg ctt tgg ctt ggt act ttc cct act gct caa gaa gct gct			511
Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln Glu Ala Ala			
100	105	110	115
tct gct tat gat gag gct gct aaa gct atg tat ggt cct ttg gct cgt			559
Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro Leu Ala Arg			
120	125	130	
ctt aat ttc cct cgg tct gat gcg tct gag gtt acg agt acc tca agt			607
Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Ser			
135	140	145	
cag tct gag gtg tgt act gtt gag act cct ggt tgt gtt cat gtg aaa			655
Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val His Val Lys			
150	155	160	
aca gag gat cca gat tgt gaa tct aaa ccc ttc tcc ggt gga gtg gag			703
Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly Gly Val Glu			
165	170	175	
ccg atg tat tgt ctg gag aat ggt gcg gaa gag atg aag aga ggt gtt			751

Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys Arg Gly Val  
 180 185 190 195  
 aaa gcg gat aag cat tgg ctg agc gag ttt gaa cat aac tat tgg agt 799  
 Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn Tyr Trp Ser  
 200 205 210  
 gat att ctg aaa gag aaa gag aaa cag aag gag caa ggg att gta gaa 847  
 Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly Ile Val Glu  
 215 220 225  
 acc tgt cag caa caa cag cag gat tcg cta tct gtt gca gac tat ggt 895  
 Thr Cys Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala Asp Tyr Gly  
 230 235 240  
 tgg ccc aat gat gtg gat cag agt cac ttg gat tct tca gac atg ttt 943  
 Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser Asp Met Phe  
 245 250 255  
 gat gtc gat gag ctt cta cgt gac cta aat ggc gac gat gtg ttt gca 991  
 Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp Val Phe Ala  
 260 265 270 275  
 ggc tta aat cag gac cgg tac ccg ggg aac agt gtt gcc aac ggt tca 1039  
 Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala Asn Gly Ser  
 280 285 290  
 tac agg ccc gag agt caa caa agt ggt ttt gat ccg cta caa agc ctc 1087  
 Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu Gln Ser Leu  
 295 300 305  
 aac tac gga ata cct ccg ttt cag ctc gag gga aag gat ggt aat gga 1135  
 Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp Gly Asn Gly  
 310 315 320  
 ttc ttc gac gac ttg agt tac ttg gat ctg gag aac taaaacaaaaac 1181  
 Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn  
 325 330 335

aatatgaagc ttttggatt tgatattgc cttaatccca caacgactgt tgattctcta 1241  
tccgagttt agtgatatacg agaactacag aacacgttt ttcttgttat aaaggtaac 1301  
tgtatatac gaaacagtga tatgacaata gagaagacaa ctatagtttgc tttagtctgct 1361  
tctcttaagt tgttcttag atatgttttca tgtttgtaa caacaggaat gaataataca 1421  
cacttgtaaa aaaaaaa

<210> 8

<211> 353

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 8

gctagcagag tagcaatcca ttccgatcca tcaaatttct cttgagaccg tagagagaga 60  
gagaggcgcc aaccatggcc ggcacatcatcc acaagatcga ggagaagctc cacatggcg 120  
gaggcgagca caagaaggaa gacgagcaca agaaggaggg ggagcaccac aagaaggacg 180  
gggagcacaa ggaaggcgtg gtggagaaga tcaaggacaa gatcaccggc gaccacggcg 240  
acggcggcga gcacaaggag aagaaggaca agaagaagaa gaaggagaag aagcacggcg 300  
aggagggcca ccaccacgac ggccacagca gcagcagcag cgacagcgcac tgg 353

<210> 9

<211> 545

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 9

cgactatcat tacaaggaaa tttaagcgac cacgaagagt atgacgctgg tgaagattgg 60  
tccgtggggc ggaaatggag ggtcagctca ggacatcagt gtgccaccca agaagctgtt 120

aggcgtgaca atctacagct cagatgcaat cagatccatt gccttcaact acatcggtgt 180  
 gnatggacag gaatatgccatg gggtgggggc gaaggcacct ctacagagat 240  
 taaactgggc tcctctgagc agatcaagga gatttctgga acccatggcc cagtctatga 300  
 tctggctgac attgtcacct atcttaagat tgtgacaagt gctaataata catacgaggc 360  
 tggagtccca aatggaaagg aattcagcat tccactgcaa gactctggcc atgtcggtgg 420  
 attcttgga aggtctggaa cgcttatcga cgcaattggc atctacgtcc acccttgatt 480  
 cccagtggtc aaagaattac tacctactac catatctacg aaataatgtt ccatgggttt 540  
 gttgt 545

<210> 10  
 <211> 1357  
 <212> DNA  
 <213> Oryza sativa

<400> 10  
 agccgtggaa gtccaacctg caggctcagg ctgcagatcg cccaaggcgc acttgcctcc 60  
 acgatggctt gtcctcaacc gctcggaaagg cgagatccaa ttggcaattt gttcaacgca 120  
 gggagagagg aggagactgg aacgggatca ttggacattt gttgatgaat tgcaatttgg 180  
 atgacgaggc cgcgagggtc agaccgtcgg agagttagat gatggttata caagtgtact 240  
 agtaggacgg acggtgtgcac cggccagaag cagcagattt tgtgcaaacg ttgagccgc 300  
 aacacgtggc cggcatcgac ccgctacacg gacgcagcgc cccccccccc cccccccccc 360  
 cggacccacg cgggccggcc ggcgtgtcgc cgtgctgccc actacggcgt cggaaatcaac 420  
 gcgtccgcct cgatcctccc ctgcccacgc tgtacaagtgc gcgaccagaa aacaccatgt 480  
 agtattttagt ctcgtctaag agcaagttt atactatagt ccactatttgc ctccaatttt 540  
 tttataactg atctaatacg caattcacac aataattgct tactatacta ttaatataatg 600  
 gtctcacatg tcatacacat attccgtctt ggagttcggt ctgcagctgg ctacagatct 660  
 gtagcccgct gctcttctct ctcagagcga gtataatagt acaaactggc ctggcgatag 720  
 gagaaaacacg tcagctacag tggtagctg gatgagtgag aagaggagag agagtgagag 780

tggcgacaa tttatcgcc ggctctagca ccagcttcga gagaaaagtg gtgagcgcag 840  
 aggttgtgag ctgcattgtt gagacgaagc ttaagttatt ttattatgtat gtgaagttga 900  
 tgggtccagc gttgcaggc atttattgtt ttcacaagat gcaaagagag ctactagctg 960  
 agttggatgg aattaacgcc ggctgtctac gctactattt accttgctct catctttat 1020  
 ctcataaaaa tatattata gctggctaattt agtctgctat cgtacctgct ctaatgcata 1080  
 cgccccctt ctctgtggca aaacggttgg tgcgttacac ggggtgcacg aagccatgca 1140  
 tcaccctgct caacccgtct ccttttttag cctaattttt tcctccattt ccgatgggcc 1200  
 ttccgtttctt caagacacccc ccacacccgc ccggccctct ataaataccat accacgacga 1260  
 gccaagcgaa catcaccaca gctagatcat tagcaatcca ttccgatcca tcaaattttctt 1320  
 cttgagaccg tagagagaga gagaggcgc aaccatg 1357

### 【配列表フリーテキスト】

配列番号3－人工配列の説明：プライマー

配列番号4－人工配列の説明：プライマー

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

図1は、各ストレス負荷時におけるa0022(lip9)のノザン解析結果を示す。

#### 【図2】

図2は、a0022(lip9)のプロモーター領域の塩基配列を示す。

#### 【図3】

図3は、Gus発現用コンストラクトの構造を示す。

( $T_g7$  : g7 ターミネーター、HPT : ハイグロマイシン フォスフォトランスフェラーゼ、 $P_{nos}$  : Nos プロモーター、 $T_{nos}$  : Nos ターミネーター)

#### 【図4】

図4は、各種プロモーターにGUS遺伝子を連結して導入した形質転換タバコ又はイネにおける、乾燥ストレス負荷時のGUS活性を示すグラフである。

#### 【図5】

図5は、lip9プロモーターにGUS遺伝子を連結して導入した形質転換イネにおける、塩ストレス負荷時のGUS染色結果を示すグラフである。

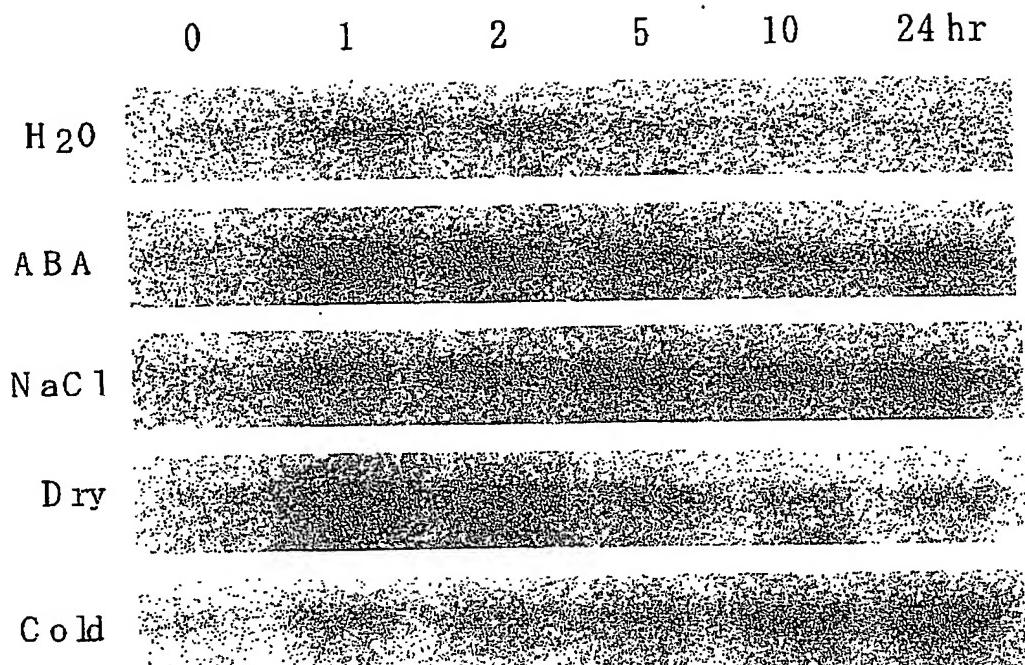
## 【図6】

図6は、形質転換イネと野性株における、導入遺伝子及び各標的遺伝子（*lip9* (a0022)、*Wsi724*(a0066)、*salT*(a2660)の発現量をノザン法で比較した結果である。図中 a、b、c はそれぞれそれぞれ形質転換体のラインを示す。

【書類名】 図面

【図1】

a0022(lip9)



各ストレス処理におけるノザン解析

【図2】

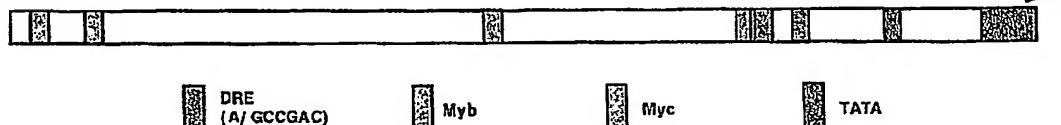
lip 9

10	TCATCAGCTA	20	TCATCAAAGC	30	GAAGGAAAGA	40	AAGAAAAATA	50	AAAGGAAAAG	60	AACTGGCTGG
70	AAATTAGAGA	80	AGCCCCGGAC	90	GACICGATC	100	GGGGGTGGCA	110	ATTAATCAG	120	TGTGATCAAC
130	<u>ACGGATAACT</u>	140	TATCCCGTCC	150	GACCAAATCC	160	ACCAACCAAA	170	CCAAGACCCG	180	Myb
190	CTCTGAAAGA	200	CGGATCAGTG	210	GGACCCCTGAT	220	CTACGGACCC	230	CATAATCAC	240	CGTCCAGGTC
250	TCTGGATCTC	260	TCCCCGTGTC	270	CTAACAGAC	280	ACUGEGCGCG	290	CGGTGCCGTC	300	GCTCTCGAGC
310	CGTGTCCCAGC	320	TUCCAACACTG	330	TCACAAAAGC	340	GATCACAGAC	350	TCTTCCTTCC	360	TCTGCTGGGA
370	GAGAAGAAAA	380	ATTGGCCGGCG	390	ATGATGCCGA	400	TAAAGAGGAA	410	AAAGGGATGA	420	GAATCCGATG
430	GAAAAAAACT	440	GATGTTAAC	450	TATCCCTACT	460	GCTGCCACT	470	AAGAUGAAC	480	GTATCCGAAC
490	AAGAAACGCT	500	TACGTTACTG	510	TTCCCTAAATG	520	GATCGCTCCG	530	CTCATCACTT	540	AACCAAAAT
550	CGATTAGGAA	560	ATTGACGGAC	570	AGCGACGCC	580	GAAGCCAAGT	590	GTCTCGTCCG	600	GTAGGCCTCG
610	AGGCCTCGAA	620	GCAGAGGGAG	630	CGGAGAGGCG	640	GACGCCGCC	650	CCACGCCCTCC	660	TCTCCCTCGG
670	TGACACGGCC	680	GTCTGGCTCC	690	ACATGGGCC	700	GACCTCTCCC	710	GATGCGTCCA	720	CCCCCTCCGA
730	GGCACCGCCA	740	CGTCGGAAACC	750	AGCCGGCCCG	760	CCCACGGCGAT	770	TGCGGACACG	780	CGTCGGGGCG
790	CCACTGGCTC	800	ACCCGCTGCC	810	TGCCCTCTGCC	820	TGCCCTCTGCC	830	CTCGTCCCA	840	TTTCCCCCCC
850	ACGCTTCTG	860	TCCTUGUGTC	870	GCCTACGGCT	880	ACGTACGATA	890	CAAACGCCGC	900	ACCTTTCCGAT
910	CCCCCTCCGCT	920	ATATAAGGAA	930	GGCATCTGCC	940	TCGCCACCTT	950	AAGCAAAACG	960	
970	CACTCGTCAC	980	TATA	990	AGTCAGAGC	1000	GAATAGTTCT	1010	TGCTGATCTG	1020	TGTTTGATT
1030	ACTTTAGITC	1040	TCGAGAGGCT	1050	TTAGCTGAAT	1060	CCATCGATCA	1070	TGGAGGATGA	1080	GAGGAACA..

ORF

ORF

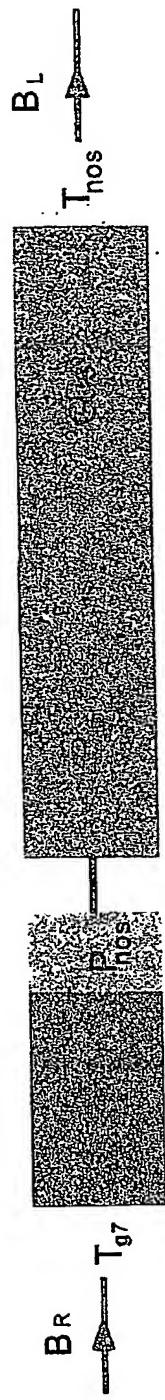
lip 9



lip 9 のプロモーター領域の塩基配列

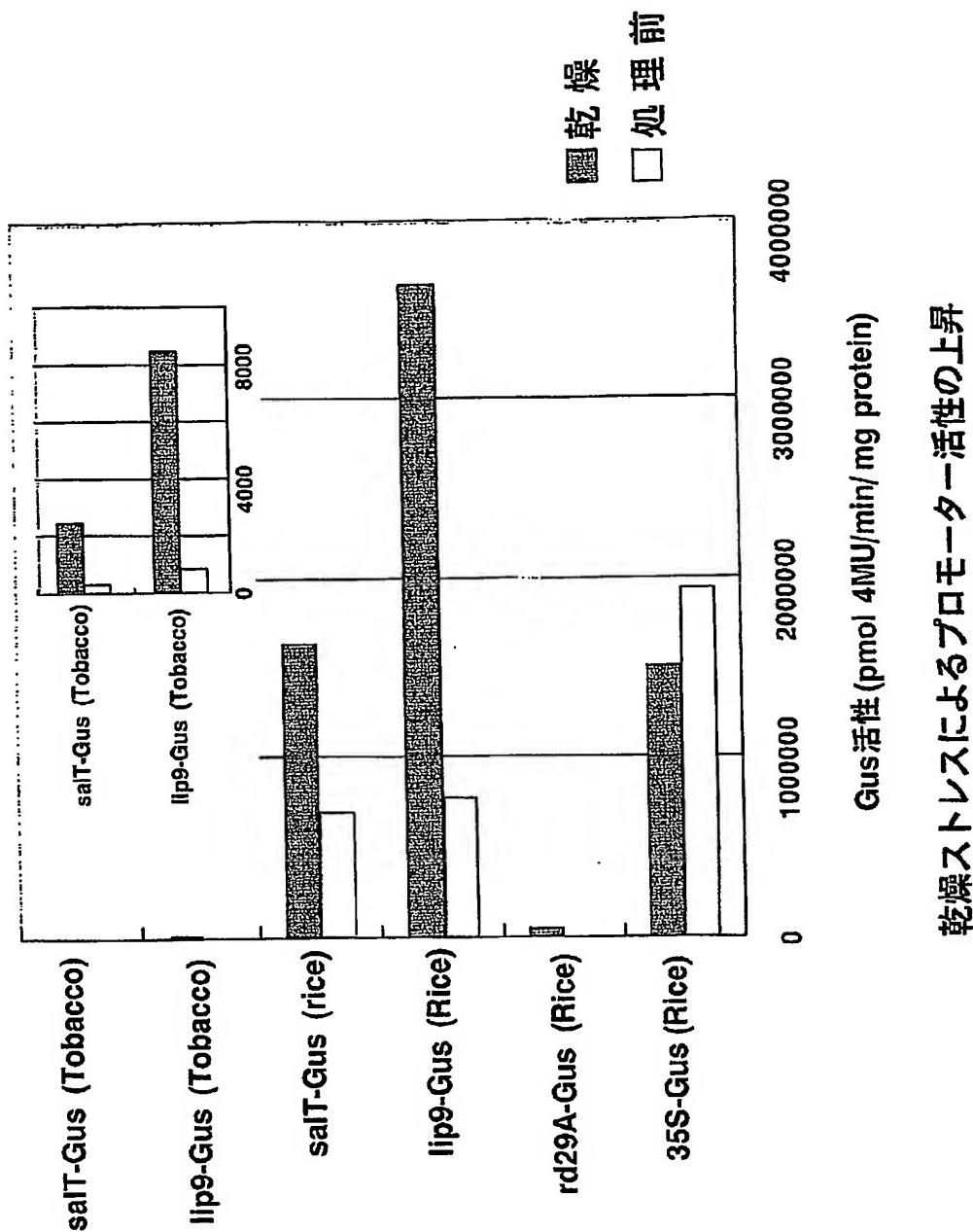
【図3】

lip9:Gus コンストラクト



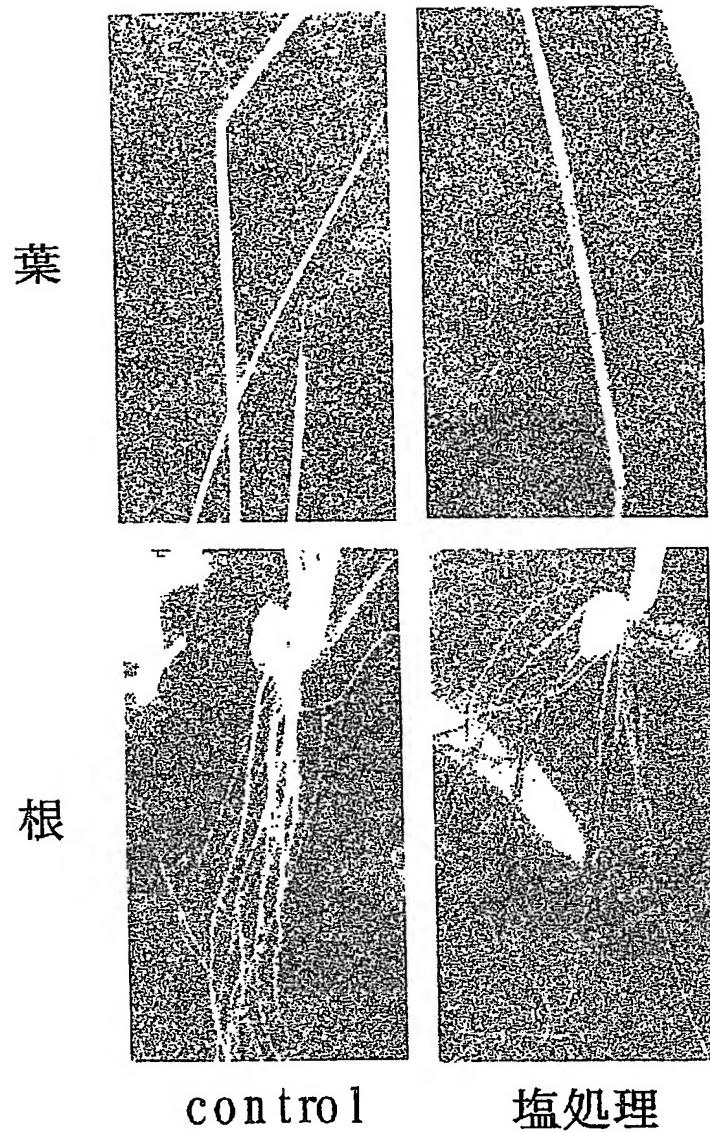
Gus発現用コンストラクトの構造

【図4】



乾燥ストレスによるプロモーター活性の上昇

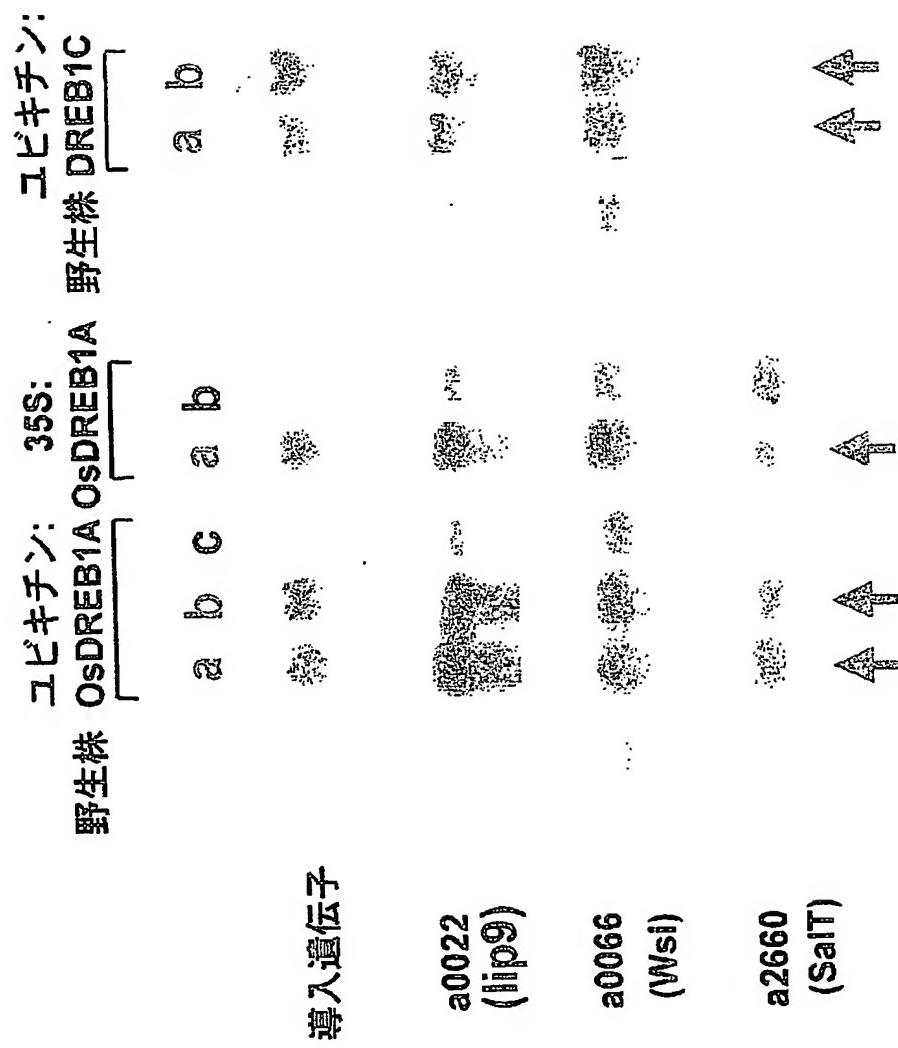
【図5】



lip9-Gusを導入したイネの塩処理後のGus染色

【図6】

遺伝子組み換えイネ中の導入遺伝子とターゲット遺伝子の発現



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 イネ等の单子葉植物で有効に機能するストレス誘導性プロモーター、及び該プロモーターを用いた環境ストレス耐性植物の提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる、イネ由来のプロモーター。

- (a) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNA
- (b) 配列番号1又は配列番号10で表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス誘導性のプロモーター活性を有するDNA、及び前記プロモーターを導入した環境ストレス耐性植物。

特願 2003-080847

出願人履歴情報

識別番号 [501174550]

1. 変更年月日 2001年 4月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市大わし1-1  
氏 名 独立行政法人 国際農林水産業研究センター

特願 2003-080847

## 出願人履歴情報

識別番号 [000195568]

1. 変更年月日 2001年 5月15日

[変更理由] 住所変更

住 所 埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2  
氏 名 生物系特定産業技術研究推進機構

2. 変更年月日 2003年 4月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 埼玉県さいたま市北区日進町1丁目40番地2  
氏 名 生物系特定産業技術研究推進機構